

REQU 05 AVR. 2004

OMPI PCT



# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 21 JAN. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

BEST AVAILABLE COPY



INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 210502

Réservé à l'INPI

### REMISE DES PIÈCES

DATE

17 JAN 2003

LIEU

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0300507

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

17 JAN. 2003

PAR L'INPI

### Vos références pour ce dossier

(facultatif) 240212 D20796 BF

### 1. NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet REGIMBEAU  
20, rue de Chazelles  
75847 PARIS CEDEX 17  
FRANCE

### Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

### 2. NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

*Demande de brevet initiale*

N°

Date

*ou demande de certificat d'utilité initiale*

N°

Date

Transformation d'une demande de

brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date

### 3. TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

MÉDICAMENTS POUR LE SYSTÈME NERVEUX

### 4. DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE  
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE  
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

### 5. DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale

☐ Personne physique

Nom  
ou dénomination sociale

MAPREG

Prénoms

Forme juridique

SOCIÉTÉ À RESPONSABILITÉ LIMITÉE

N° SIREN

433430386

Code APE-NAF

Domicile  
ou  
siège

Rue

17, rue du Faubourg Montmartre 75009 PARIS

Code postal et ville

Pays

FRANCE

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

- Française

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

17 JAN 2003

LIEU

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0300507

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		240212 BF
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		Cabinet REGIMBEAU
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	20, rue de Chazelles
	Code postal et ville	75017 PARIS CEDEX 17
	Pays	
N° de téléphone (facultatif)		01 44 29 35 00
N° de télécopie (facultatif)		01 44 29 35 99
Adresse électronique (facultatif)		info@regimbeau.fr
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG <input type="checkbox"/>
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », indiquez le nombre de pages jointes		
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>

L'invention se rapporte à une nouvelle utilisation de dérivés de neurostéroïdes, notamment de la prégnénolone, pour le traitement des lésions aiguës ou chroniques du système nerveux, en particulier certaines maladies neurodégénératives, liée notamment à leur aptitude à stabiliser et /ou augmenter la polymérisation des microtubules neuronaux.

Une altération du cytosquelette des neurones est observée dans la plupart des lésions du SNC et des maladies neurodégénératives. Cette altération peut être la conséquence mais aussi la cause d'une souffrance des cellules affectées. En effet, une dépolymérisation des microtubules peut être directement responsable du dysfonctionnement de certains neurones et entraîner leur mort. De plus, ces altérations affectent le nombre et la longueur des prolongements neuritiques des cellules neuronales restantes et par conséquent diminuent leur efficacité. Un traitement avec du NGF qui prévient l'atrophie dendritique permet une meilleure récupération fonctionnelle après une lésion du cortex cérébral chez le rat (Kolb et al., *Neuroscience* 1996). La dégradation du cytosquelette observée après un traumatisme du SNC (Zhang et al., *J Neuropathol exp Neurol* 2000) ou un épisode d'ischémie, résulte de nombreux facteurs, en particulier de l'augmentation du glutamate et du  $Ca^{++}$  intracellulaire qui entraîne une dépolymérisation des microtubules, et de l'activation de protéases comme la Calpaïne qui dégradent MAP2. L'utilisation d'un inhibiteur de la calpaïne (Schumacher et al., *J Neurochem* 2000) et du relargage du glutamate (Springer et al., *J Neurochem* 1997) permet de diminuer les conséquences d'un traumatisme médullaire chez l'animal en préservant partiellement le cytosquelette.

La réparation des lésions récapitule le développement. L'existence de cellules souches dans certaines régions du système nerveux central est actuellement bien établie. Les lésions stimulent la prolifération de ces cellules. Cependant ces cellules doivent migrer et se différencier. La différenciation implique au premier chef le développement du cytosquelette.

Les protéines MAP2 représentent un des constituants majeurs des protéines associées aux microtubules neuronaux. Elles sont présentes dans toutes les

extensions de ce qui constitue l'arborisation dendritique d'un neurone, arborisation dont on connaît l'importance pour l'établissement des connexions synaptiques (Matus, *Microtubules* 1994 ; Sanchez et al *Prog.Neurobiol* 2000). Les protéines MAP2 sont absolument requises pour la formation des dendrites comme le montrent  
 5 les travaux d'auteurs qui, par la suppression de synthèse de MAP2 ont provoqué soit l'arrêt de croissance neuritique dans des neurones en culture (Caceres et al, *Neuron* 1992) soit l'arrêt de croissance dendritique chez des souris « knock out » pour le gène MAP2 (Harada et al, *J.Cell.Biol.* 2002). La synthèse des protéines MAP2 n'est pas à elle seule suffisante pour induire ce processus de croissance  
 10 dendritique. Certains stéroïdes comme l'oestradiol ou la progestérone peuvent induire une augmentation de synthèse de MAP2 (Reyna-Neyra et al, *Brain Res.* 2002) sans induire de changements morphologiques spectaculaires. Par contre, certaines molécules se liant à MAP2 ont la propriété fort importante et originale de renforcer l'activité de cette protéine, à savoir son rôle dans l'activation du processus  
 15 de polymérisation de la tubuline (Murakami et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 2000) et l'établissement de structures microtubulaires d'une plus grande stabilité.

Il a été récemment montré que, après une ischémie cérébrale, des cellules souches pouvaient se différencier en neurones et s'intégrer dans les circuits neuronaux existant (Nakatomi et al., *Cell* 2002). La stimulation de la croissance des  
 20 neurites de ces cellules par des molécules améliorant la polymérisation de la tubuline pourrait augmenter leur fonctionnalité.

Malgré de nombreuses recherches, aucune cible spécifique autre que des MAPs, n'a été identifiée à l'heure actuelle pour la PREG.

La protéine MAP2 est principalement présente dans les neurones. Les  
 25 molécules se liant à MAP2 ont donc pour cible les cellules nerveuses. Ainsi, il est probable qu'elles n'ont pas d'action notable sur les autres types cellulaires dans lesquelles la concentration en MAP2 est très faible.

Les études montrant un effet de la prégénolone (PREG) *in vivo* sont peu  
 30 nombreuses mais sont en faveur d'un rôle bénéfique de ce stéroïde. Il a été montré que la PREG diminuait la réaction astrocytaire après une lésion cérébrale (Garcia-Estrada et al, *Int J Devl Neuroscience* 1999) et l'augmentation de la taille des astrocytes observée au cours du vieillissement (Legrand et Alonso, *Brain Res*

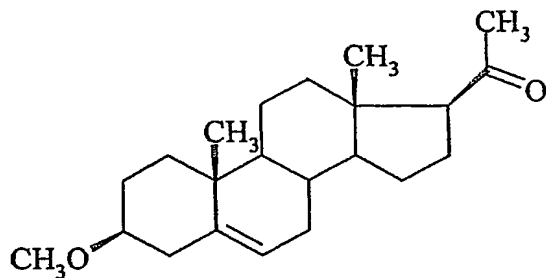
1998). Elle contribuait aussi à améliorer la récupération fonctionnelle après un traumatisme médullaire (Guth et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1994), La PREG protège des cellules issues d'une lignée hippocampique (HT-22) d'une toxicité induite par le glutamate et la protéine bêta amyloïde (Gursoy et al.; *Neurochem Res* 5 2001).

La PREG est le précurseur de toutes les hormones stéroïdes. Leur synthèse implique la conversion de la structure  $\Delta 5-3\beta\text{-OH}$  de la PREG en structure  $\Delta 4-3\text{-Céto}$  (assurée par une enzyme dénommée  $3\beta\text{HSD}$ ). La Demanderesse a bloqué la structure  $\Delta 5-3\beta\text{-OH}$  pour empêcher son métabolisme et empêcher également la 10 formation d'ester sulfate de PREG, molécule qui peut être neurotoxique à hautes concentrations. Ainsi, la Demanderesse a mis en évidence un composé, la 3-méthoxy-prégnénolone ( $3\beta\text{méthoxy-prégna-5-ène-20-one}$ , en abrégé 3-méthoxy-PREG), qui possède cette propriété et qui de plus est au moins aussi actif que la PREG. La stabilité métabolique de ce composé a été vérifiée par spectrométrie de 15 masse couplée à la chromatographie gazeuse.

La Demanderesse considère ainsi que l'invention se rapporte à la 3-méthoxy-PREG, mais aussi à toutes les molécules dérivées de la prégnénolone, portant une fonction 3-méthoxy ou présentant une fonction 3' pouvant être 20 convertie en 3-méthyl-éther. Ces molécules sont alors incapables de se convertir en métabolites pourvus d'activités progestatives (la progestérone est un métabolite directe de la PREG et, en plus de son activité hormonale, elle est un antagoniste de la PREG pour la polymérisation des microtubules), androgéniques, estrogéniques et glucocorticoïdes. Elles ne peuvent pas également se convertir en esters sulfates qui, 25 à l'instar du sulfate de PREG, pourraient avoir des effets neurotoxiques.

Dans le cadre de la présente invention, la Demanderesse a mis en évidence le fait que la 3-méthoxy-PREG, ou d'autres molécules selon l'invention peuvent jouer un rôle majeur dans la polymérisation et/ou la stabilisation des microtubules, et présente des activités tout à fait remarquables, pour le traitement de pathologies 30 liées au système nerveux.

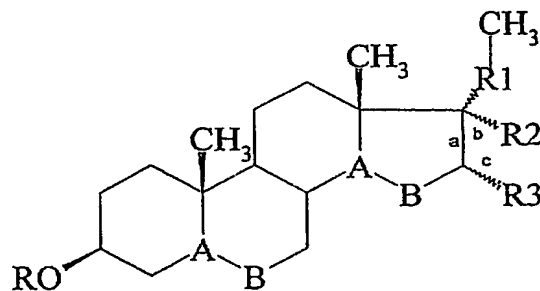
La 3-méthoxy-PREG présente la formule suivante :



Ainsi, l'invention se rapporte à l'utilisation de la 3-méthoxy-PREG ou d'une molécule dérivée de la prégénolone portant une fonction 3-méthoxy ou présentant une fonction 3' pouvant être convertie en 3-méthyl-éther, pour la préparation d'un médicament destiné à traiter une lésion aiguë ou chronique ou une maladie dégénérative du système nerveux, en particulier celles qui s'accompagnent de déficits neurologiques, cognitifs et neuropsychiques, ou de troubles sensoriels ou sensitifs (notamment les névralgies).

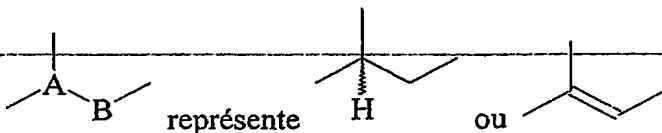
D'une façon plus générale, l'invention se rapporte à l'utilisation d'une molécule de formule générale I, pour la préparation d'un médicament destiné à traiter une lésion aiguë ou chronique ou une maladie dégénérative du système nerveux, en particulier celles qui s'accompagnent de déficits neurologiques, cognitifs et neuropsychiques, ou de troubles sensoriels ou sensitifs (notamment les névralgies).

Les molécules envisagées, dérivées de la prégénolone, dans le cadre de la présente invention présentent la formule générale I :



dans laquelle :

20  $R = H$  ou  $CH_3$  ;

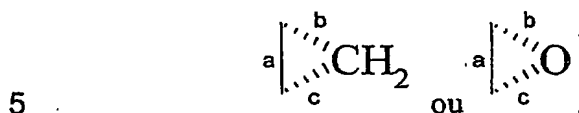


$R1 = -CO- ; -CH(OH)-$  ou  $-CH(O-COCH_3)-$

$R2 = H$  ou  $CHCl_2$ ,

$R3 = H$  ou  $CH_3$ , ou

$R2$  et  $R3$  forment ensemble un cycle :



Dans un mode de réalisation préféré,  $R = CH_3$ .

Dans un mode de réalisation préféré, ladite molécule est la 3-méthoxy-PREG (3 $\beta$ -méthoxy-prégna-5-ène-20-one).

- 10 Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la 3 $\beta$ -méthoxy-prégna-5-ène-20-one-17- $\alpha$ -dichlorométhyl.

Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la 3 $\beta$ -méthoxy-5 $\alpha$ -prégnane-20-one.

- 15 Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la 3 $\beta$ -méthoxy-5 $\alpha$ -prégnane-20 $\beta$ -ol.

Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la PREG-16 $\alpha$ -méthyl.

Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la PREG-16 $\beta$ -méthyl.

- 20 Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la 3 $\beta$ -hydroxy-prégna-5,14-diène-20-one.

Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la PREG-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -époxy.

- 25 Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la PREG-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -méthylène.

Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la Prégna-5-ène-3 $\beta$ ,20 $\beta$ -diol-20-acétate.

Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -prégnane-20-one-16 $\alpha$ -méthyl.



Dans un mode de réalisation particulier, ladite molécule est une molécule telle que citée ci-dessus dans laquelle la fonction 3-hydroxy a été changée en fonction 3-méthoxy.

5 Dans un mode de réalisation, ladite maladie est choisie dans le groupe constitué par la maladie d'Alzheimer, la perte de mémoire induite par l'âge (oubli bénin) ou par la prise de substances, une lésion traumatique, une lésion cérébrale, une lésion de la moelle épinière, en particulier une compression médullaire, l'ischémie, la douleur, notamment la douleur névritique, la dégénérescence  
10 nerveuse, et la sclérose en plaques.

La 3-méthoxy-PREG peut également, dans le cadre de la présente invention être utilisée pour préparer un médicament utile pour le traitement d'autres syndromes comme le ralentissement mental et la perte de concentration, la douleur incluant, la douleur aiguë, la douleur post-opératoire, la douleur chronique, la  
15 douleur nociceptive, la douleur neuropathique, les syndromes de douleur psychogéniques, certains états psychiatriques (notamment les états dépressifs), des épisodes dissociatifs incluant l'amnésie dissociative, la fugue dissociative et le désordre d'identité dissociatif, d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, la maladie d'Huntington, les maladies liées aux prions, la  
20 Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), la sclérose en plaques.

D'une façon générale, on utilise la 3-méthoxy-PREG ou la molécule dérivée selon l'invention pour le traitement de toute maladie pour laquelle une polymérisation et/ou une stabilisation accrue des microtubules est recherchée ou bénéfique.

25 Dans un mode de réalisation préféré, et notamment pour le traitement des maladies liées à un dérèglement du système nerveux central, ledit médicament comprend également un excipient ou un composé permettant de formuler ladite 3-méthoxy-PREG pour permettre une meilleure traversée de la barrière hémato-encéphalique. Un tel excipient ou composé peut aussi permettre une traversée plus  
30 rapide ou plus durable de ladite barrière hémato-encéphalique.

Un tel excipient ou composé peut être un peptide, tels les peptides décrits dans la demande WO 00/32236, ou de la 2-pyrrolidone.

Les compositions pharmaceutiques utilisées dans l'invention peuvent être administrées par n'importe quelle voie d'administration incluant, mais sans se limiter, la voie orale, intraveineuse, intramusculaire, intra artérielle, intra médullaire intra ventriculaire, transdermique, sous-cutanée, intra péritonéale, intra nasale, entérale, topique, sublinguale, ou rectale.

On peut envisager un traitement continu ou à long terme directement effectué par l'intermédiaire du liquide cérébro-spinal en utilisant une pompe implantée dans l'espace subarachnoïdien du cerveau ou de la moelle épinière. Un tel implant pourrait contenir une solution concentrée de 3-méthoxy-PREG (par exemple du liquide céphalo-rachidien ou des cellules construites pour surproduire et sécréter une quantité suffisante de 3-méthoxy-PREG.

De plus, la 3-méthoxy-PREG peut être administrée avec d'autres composés d'agents biologiquement actifs (par exemple des tensioactifs, des excipients, des transporteurs, des diluants et/ou des véhicules pharmaceutiquement acceptables). Ces composés sont bien connus de l'homme du métier. On peut trouver des détails sur ces produits dans la dernière édition de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

Dans les compositions pharmaceutiques de la présente invention pour l'administration orale, sublinguale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, transdermique, locale ou rectale, l'ingrédient actif (3-méthoxy-PREG ou molécule dérivée) peut être administré sous formes unitaires d'administration, en mélange avec des supports pharmaceutiques classiques, applicables aux animaux ou aux êtres humains. Les formes unitaires d'administration appropriés comprennent les formes par voie orale telles que les comprimés, les comprimés enrobés, les dragées, les gélules et capsules de gélatine molle, les poudres, les granules et les solutions ou suspensions orales, les formes d'administration sublinguale et buccale, les formes d'administration sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intranasale ou intraoculaire et les formes d'administration rectale.

Les compositions pharmaceutiques peuvent également contenir des conservateurs, solubilisants, stabilisants, agents mouillants, émulsifiants, édulcorants, colorants, arômes, des sels destinés à modifier la pression osmotique, des tampons, des correcteurs de goût ou des antioxydants. Elles peuvent également contenir d'autres substances thérapeutiquement actives.

Ainsi, les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent également contenir d'autres agents neuroprotecteurs, notamment, des composés qui augmentent la régénération neuronale. De tels agents peuvent être en particulier choisis parmi les facteurs de croissance des neurones comme les facteurs de  
 5 croissance des fibroblastes (FGF), acide ou basique, FGF-3, FGF-4, FGF-6, ou le facteur de croissance des kératinocytes (KGF). On peut également envisager l'ajout d'un agent neuroprotecteur tel le facteur de croissance nerveux (NGF), le facteur neutotrophique dérivé du cerveau (BDNF), la neurotrophine 3 ou 4, le TGF- $\beta$ .1, les interleukines, les facteurs de croissance dérivés de l'insuline (IGF).

10 On peut aussi utiliser tout autre type d'agents thérapeutiques antioxydants neuroprotecteurs, notamment les inhibiteurs du glutamate.

Lorsque l'on prépare une composition solide sous forme de comprimés, on mélange l'ingrédient actif principal avec un véhicule pharmaceutique tel que la gélatine, l'amidon, le lactose, l'acide stéarique ou le stéarate de magnésium, le talc,  
 15 la gomme arabique ou analogues. On peut enrober les comprimés de saccharose ou d'autres matières appropriées ou encore on peut les traiter de telle sorte qu'ils aient une activité prolongée ou retardée et qu'ils libèrent d'une façon continue une quantité prédéterminée de principe actif.

On obtient une préparation en gélules en mélangeant l'ingrédient actif avec  
 20 un diluant et en versant le mélange obtenu dans des gélules molles ou dures, avec comme excipient des huiles végétales, des cires, des graisses, des polyols semi-solides ou liquides etc...

Une préparation sous forme de sirop ou d'elixir peut contenir l'ingrédient actif conjointement avec un édulcorant, un antiseptique, ainsi qu'un agent donnant  
 25 du goût et un colorant approprié. On utilise des excipients tels l'eau, les polyols, le saccharose, le sucre inverti, le glucose...

Les poudres ou les granules dispersibles dans l'eau peuvent contenir l'ingrédient actif en mélange avec des agents de dispersion ou des agents mouillants, ou des agents de mise en suspension, de même qu'avec des correcteurs  
 30 du goût ou des édulcorants.

Pour une administration rectale, on recourt à des suppositoires qui sont préparés avec des liants fondant à la température rectale, par exemple du beurre de

cacao ou des polyols semi-solides ou liquides tels les polyéthylèneglycols, des cires, des huiles naturelles ou hydrogénées, des graisses...

Pour une administration parentérale, intranasale ou intraoculaire, on utilise des suspensions aqueuses, des solutions salines isotoniques ou des solutions stériles  
 5 et injectables qui contiennent des agents de dispersion et/ou des agents mouillants pharmacologiquement compatibles. On peut utiliser, comme excipient, l'eau, des alcools, des polyols, le glycérol, des huiles végétales...

Le principe actif peut être formulé également sous forme de microcapsules, éventuellement avec un ou plusieurs supports additifs.

10 Pour le traitement de la douleur, la voie d'application topique est la voie d'administration préférée. Ici, les compositions selon l'invention peuvent être présentées sous forme d'un gel, d'une pâte, d'un onguent, d'une crème, d'une lotion, d'une suspension liquide aqueuse, aqueuse-alcool, d'une solution huileuse, d'une dispersion du type lotion ou sérum, d'un gel anhydre ou lipophile, ou d'une  
 15 émulsion de consistance liquide ou semi-solide de type lait, obtenue en dispersant une phase grasse dans une phase aqueuse ou vice versa, ou de suspensions ou les émulsions de cohérence(consistance) douce, semi-solide de la crème ou le type de gel, ou alternativement de microémulsions, de microcapsules, de microparticules ou de dispersions vésiculaires au type ionique et-ou nonionique. Ces compositions sont  
 20 préparées selon des méthodes standard.

De plus, un tensioactif peut être inclus dans la composition afin de permettre une pénétration plus profonde de la 3-méthoxy-PREG.

Parmi les ingrédients envisagés, l'invention comprend les agents permettant une augmentation de pénétration choisis par exemple dans le groupe consistant en  
 25 l'huile minérale, l'éthanol, la triacétine, la glycérine et le glycol de propylène; des agents de cohésion sont choisis par exemple dans le groupe consistant en le polyisobutylène, l'acétate de polyvinyle, l'alcool de polyvinyle et les agents d'épaississement.

Ainsi, dans un premier mode de réalisation, ledit médicament se présente  
 30 sous forme injectable.

Dans un autre mode de réalisation, ledit médicament se présente sous forme permettant une prise orale.

D'une manière préférée, ledit médicament comprend une quantité efficace de 3-méthoxy-PREG, en particulier comprise entre 50 et 2500 mg par voie parentérale.

Ledit médicament comprend préférentiellement une quantité efficace de 3-méthoxy-PREG ou de molécule dérivée de la prégnénolone présentant une fonction 3-méthoxy, telle que la quantité administrée au patient soit comprise entre 1 et 100 mg / kg.

Une quantité efficace de 3-méthoxy-PREG est une quantité qui permet la stabilisation et/ou polymérisation des microtubules après administration à l'hôte. Ainsi, l'administration d'une quantité efficace de 3-méthoxy-PREG aboutit à l'amélioration ou l'élimination de la maladie. La quantité de 3-méthoxy-PREG administrée à l'hôte variera en fonction de facteurs, y compris la taille, l'âge, le poids, la santé générale, le sexe, le régime alimentaire et le moment de l'administration, la durée ou les particularités de la maladie associée à la dépolymérisation/déstabilisation des microtubules. Par exemple, le dosage devra réaliser, au niveau du site d'action, une concentration de l'ordre de 0,5 à 100  $\mu\text{M}$ . L'ajustement des doses est bien connu de l'homme du métier.

L'invention se rapporte donc à une utilisation thérapeutique de la 3-méthoxy-PREG. L'invention se rapporte donc à ce composé en tant que médicament.

Une composition pharmaceutique, comprenant de la 3-méthoxy-PREG, ou un composé dérivé de la prégnénolone ayant une fonction 3-méthoxy, en tant que principe actif, et un excipient pharmaceutiquement acceptable, est également un objet de l'invention.

La Demanderesse a mis en évidence l'activité de la 3-méthoxy-PREG pour stabiliser et/ou induire la polymérisation des microtubules d'une cellule.

Ainsi, d'une façon plus générale, l'invention se rapporte à une méthode pour augmenter la stabilisation et/ou induire la polymérisation des microtubules dans une cellule comprenant l'étape d'exposer ladite cellule en présence de 3-méthoxy-PREG, à une concentration d'environ 0,5 à 100  $\mu\text{M}$ , de préférence 0,5 à 50  $\mu\text{M}$ . La polymérisation des microtubules peut être indiquée et repérée par un immunomarquage de la protéine MAP2 associée à ces microtubules. De façon préférée, cette méthode est mise en œuvre *in vitro*, mais peut être mise en œuvre *in vivo*, ou

*ex vivo* (sur des cellules isolées d'un patient, traitées *in vitro* et réinjectées) dans certains cas.

L'invention se rapporte également à une méthode pour augmenter la pousse des neurites dans une cellule comprenant l'étape d'exposer ladite cellule en présence de 3-méthoxy-PREG, à une concentration d'environ 0,5 à 50  $\mu$ M. Cette méthode est également mise en œuvre *in vitro* de façon préférée, sans exclure d'autres modes de mise en œuvre si besoin est.

L'invention a également pour objet une méthode pour réduire la dépolymérisation des microtubules et/ou la rétractation des neurites dans une cellule, comprenant l'étape d'exposer ladite cellule en présence de 3-méthoxy-PREG, à une concentration d'environ 0,5 à 50  $\mu$ M. Cette méthode est également mise en œuvre *in vitro* de façon préférée, sans exclure d'autres modes de mise en œuvre si besoin est.

L'invention se rapporte aussi à une méthode pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie induite ou accompagnée par une dépolymérisation des microtubules chez un patient comprenant l'étape d'administration d'une quantité efficace de 3-méthoxy-PREG audit patient, ou à une méthode pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie ou d'une lésion neurodégénérative chez un patient comprenant l'étape d'administration d'une quantité efficace de 3-méthoxy-PREG audit patient.

Enfin, une méthode pour le traitement d'un patient après compression ou traumatisme médullaire comprenant l'étape d'administration d'une quantité efficace de 3-méthoxy-PREG audit patient, est également objet de l'invention.

## 25 DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1: Cinétique de polymérisation des microtubules *in vitro*: effets de la PREG (prégnénolone) et de la molécule 43B.(3-méthoxy-PREG). Un mélange de MAP2 et de tubuline purifiées est effectué en présence de GTP à 4°C dans une cuvette de spectrophotomètre. La polymérisation est induite par chauffage à 37°C et suivie par l'augmentation de densité optique (DO) indicatrice de la quantité de polymères formés. En présence de PREG et de la molécule 43B, le temps de latence est diminué alors que la vitesse de polymérisation et la quantité de microtubules sont

nettement augmentées comparativement à la cinétique témoin (control) en présence de solvant seul.

**Figure 2** : Effet de la PREG et de la 3-méthoxy-PREG (43B) sur la longueur moyenne des neurites des cellules PC12. Les cellules PC12 ont été cultivées pendant 3 jours en présence de NGF (10 ng/ml) avec ou sans (témoin) addition des molécules PREG ou 43B (30µM). Chaque molécule a été testée sur trois puits de culture. Les mesures ont été effectuées à l'aide du logiciel Scion Image sur 200 cellules par puit.

**Figure 3** : Relation dose-effet de la molécule 43B sur la longueur moyenne des neurites des cellules PC12. Les cellules PC12 ont été cultivées en présence de NGF (10 ng/ml) et de concentrations croissantes de 3-méthoxy-PREG (43B). La longueur des neurites a été mesurée sur 200 cellules par puit après 2, 5 et 8 jours de culture.

**Figure 4** : Immuno-marquage de MAP2 associé aux microtubules des cellules PC-12 traitées avec PREG ou 3-méthoxy-PREG. Les cellules PC12 ont été cultivées en présence de NGF (10 ng/ml) et de PREG ou 3-méthoxy-PREG (20 µM). Elles ont été fixées et exposées à des anticorps anti-MAP2 qui visualisent exclusivement MAP2 associée aux microtubules.

**Figure 5** : Rétraction des neurites induite par le nocodazole. Après 7 jours de culture en présence de NGF (10 ng/ml), les cellules ont été prétraitées pendant une heure avec la PREG (30µM) ou 43B (30µM), puis exposées au nocodazole pendant 15 min. (colonnes blanches : solvant DMSO seul ; colonnes grises: Nocodazole).

**Figure 6** : Effet de la molécule 43B sur la récupération locomotrice des rats après une compression médullaire. La locomotion des animaux a été évaluée en aveugle dans l'intervalle 1-28 jours après l'opération par le score BBB qui évalue le degré des paralysies (il est d'autant plus élevé que la récupération est meilleure).  
Signification statistique : \* :  $p < 0.001$  ; \*\* :  $p < 0.0001$

**Figure 7** : Cinétique d'apparition de la 3méthoxy-PREG (43B) dans le cerveau et la moelle épinière des rats après une injection sous cutanée (12mg/kg) de 43B en solution dans de l'huile de sésame.

## EXEMPLES

### Exemple 1 : synthèse de la 3-méthoxy-PREG

10 g (52 mmol) de p-toluènesulfonyl chloride sont ajoutés à une solution de 5g (15,8 mmol) de prégnénolone dans 30 ml de pyridine. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 14 heures, puis versé dans 100 ml d'eau distillée. Après refroidissement du milieu réactionnel à 0°C, l'ensemble est filtré et le solide blanc obtenu est séché sous vide pour fournir 7,4 g (98%) de tosylate de prégnénolone.

Les 7,4 g de tosylate de prégnénolone sont portés au reflux du méthanol (50 ml) pendant 4 heures. Après refroidissement et évaporation du solvant, le brut réactionnel est repris dans 100 ml d'éthyle et lavé 3 fois avec 100 ml d'une solution 10 % de bicarbonate de sodium. Après séchage de la phase organique sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, celle-ci est évaporée à sec sous pression réduite pour fournir 5,2g (100%) de 3-méthoxy-PREG sous forme d'une poudre blanche.

La prégnénolone peut être obtenue à bas prix de sources commerciales.

#### 15 **Exemple 2 : Test d'activité de la 3-méthoxy-PREG. Comparaison avec la PREG**

Ce test mesure *in vitro* l'effet de molécules sur la polymérisation des microtubules induite par MAP2. Cette polymérisation se produit quand des protéines MAP2 et de la tubuline sont mélangées à des concentrations adéquates en présence de GTP. Elle s'accompagne d'une augmentation de la densité optique mesurée à 345 nm pendant 15 à 30 minutes avec un spectrophotomètre UNICON thermostaté à 37°C (figure 1).

On voit que la molécule 43B, correspondant à la 3-méthoxy-PREG, active la polymérisation des microtubules comme la prégnénolone (PREG). D'autres molécules, comme la progestérone et le sulfate de prégnénolone, ne la stimulent pas mais sont antagonistes de la PREG (non montré).

#### **Exemple 3 : modèles cellulaires**

##### *Effet des molécules sur la croissance neuritique*

Pour tester l'effet sur la croissance neuritique de molécules sélectionnées, nous avons utilisé dans un premier temps la lignée PC12 qui est employée depuis longtemps pour de nombreuses recherches en neurobiologie. Les cellules de cette lignée, issue d'un phéochromocytome de rat, forment, en présence de NGF (Nerve Growth Factor, facteur de croissance nerveux), des prolongements neuritiques



contenant des microtubules auxquels sont associées des MAPs. La croissance de ces prolongements est stimulée par l'addition de PREG. En présence de PREG [30µM], l'augmentation de la longueur moyenne des neurites après 4 jours de culture atteint 60%. Le screening d'autres stéroïdes naturels ou synthétiques de synthèse a permis  
 5 de sélectionner plusieurs molécules présentant des effets supérieurs à ceux de la PREG (Figure 2). En particulier, l'addition de la molécule 43B, qui peut être facilement synthétisée à partir de la PREG, entraîne une augmentation spectaculaire (pouvant atteindre 500%) de la longueur des neurites formés en présence de NGF (Figure 3). Cette croissance de neurites accompagne la stimulation par 43-B de l'  
 10 association de MAP2 aux microtubules Figure 4).

#### *Effet des stéroïdes sur la résistance des microtubules au nocodazole*

Le nocodazole est un agent dépolymérisant des microtubules. Son addition à des cultures de cellules PC12, différenciées en présence de NGF, entraîne une  
 15 rétraction des neurites résultant de la dépolymérisation de leurs microtubules. Le prétraitement des cellules par la PREG ou par 43B rend les neurites résistants au nocodazole, en raison d'une augmentation de la stabilité des microtubules, condition nécessaire à la formation de longs neurites. (Figure 5).

#### 20 **Exemple 4 : Tests de toxicité**

##### *Toxicité cellulaire*

Les tests de toxicité cellulaire sont réalisés en routine sur la lignée cellulaire PC12. Les premiers résultats obtenus montrent que la PREG et le 43B ne présentent pas de toxicité à des concentrations allant jusqu'à leur limite de solubilité (environ  
 25 50µM).

##### *Toxicité in vivo*

L'injection journalière pendant 1 mois de 48mg/kg de 43B (soit 4 fois la dose active dans les traumatismes médullaires) n'a affecté ni le poids moyen ni le comportement des rats.

---

 30

#### **Exemple 5 : Expériences *in vivo* – Traumatismes médullaires**

##### *Modèle de contusion médullaire*

---

Pour déterminer les effets neuroprotecteurs des molécules testées, un modèle de compression médullaire est utilisé. Ce modèle entraîne une paralysie totale des animaux les premiers jours suivant l'opération. Cette période de paralysie est suivie d'une phase d'environ trois semaines pendant laquelle les animaux récupèrent partiellement leur fonction motrice. L'étude de cette récupération à l'aide d'un test fonctionnel simple et précis reposant sur l'observation des animaux (BBB score) permet d'étudier la vitesse et le degré de récupération des animaux avec ou sans traitement.

Deux groupes de rats ont subi une compression médullaire. Les animaux ont ensuite reçu pendant 2 semaines, une injection sous-cutanée quotidienne contenant, soit de l'huile de sésame seule (groupe témoin, n=20), soit de l'huile de sésame contenant la molécule 43B (groupe 43B, n=20 ; 12mg/kg/jour). La première injection a été effectuée 5 min après la compression médullaire. La locomotion des animaux a été évaluée en aveugle 1, 4, 7, 14, 21 et 28 jours après l'opération par le score BBB. Trois animaux ont dû être exclus de l'étude dans chaque groupe. L'analyse statistique des résultats par le test non paramétrique de Mann-Whitney montre que les animaux traités avec 43B présentent des résultats très significativement supérieurs aux animaux témoins dès le septième jour après l'opération (Figure 6).

20

#### **Exemple 6 : Expériences *in vivo* – Ischémie cérébrale**

Deux modèles d'ischémie cérébrale chez le rat ont été développés.

Le premier est un modèle d'ischémie focale permanente ou transitoire de l'artère cérébrale moyenne par électrocoagulation ou clampage (évaluation de la neuroprotection par quantification du volume de la zone lésée).

Le deuxième est un modèle d'ischémie cérébrale globale et transitoire. Ce modèle est réalisé chez le rat en électrocoagulant et sectionnant les artères vertébrales puis en clampant les artères carotides pendant une durée de 15 min (évaluation de la neuroprotection et de l'augmentation de la plasticité cérébrale par quantification de la perte neuronale dans la zone CA1 de l'hippocampe et par des tests de mémoire).

30

**Exemple 7 : Expériences *in vivo* – Modèle de maladie neurodégénérative de type Alzheimer (souris transgéniques)**

Afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de 43B pour le traitement des maladies neurodégénératives de type Alzheimer, on peut utiliser une lignée  
5 homozygote de souris transgéniques, telles les souris décrites par Götz, (EMBO J. 1995 Apr 3;14(7):1304-13).

Ces souris expriment l'isoforme humaine la plus longue de la protéine tau. Elles présentent des symptômes de dysfonctionnement neurologique qui se traduisent par une faiblesse musculaire et une diminution de la coordination motrice  
10 corrélées histologiquement à l'apparition de neurites anormaux et de protéines tau hyperphosphorylées comme dans la maladie d'Alzheimer. Cette phosphorylation pathologique diminue l'affinité de tau pour les microtubules et favorise son agrégation.

En traitant ces souris avec des molécules qui augmentent la stabilité des  
15 microtubules, on cherche à augmenter la proportion de protéine tau associée aux microtubules et de retarder ainsi l'apparition des symptômes.

**Exemple 8 : Expériences *in vivo* – Performance mnésique**

*Déficit mnésique induit par la colchicine*

20 La colchicine, une substance qui dépolymérise les microtubules sans bloquer la synthèse protéique, est injectée à des doses faibles qui n'induisent pas de mort neuronal dans l'hippocampe de rat. Ces injections entraînent un déficit d'apprentissage résultant d'une dépolymérisation durable des microtubules. L'objectif est de tester l'effet des molécules stabilisatrices des microtubules sur les  
25 déficits mnésiques et les lésions histologiques de l'hippocampe induits par la colchicine.

*Déficits mnésiques au cours du vieillissement*

Les études sur le vieillissement sont réalisées sur des rats âgés présentant des déficits mnésiques. L'objectif de cette expérimentation est de pallier ces déficits  
30 par un traitement chronique avec nos molécules.

Les expériences de mémoire en deux étapes sont basées sur l'exploration spontanée de la nouveauté et adaptées des expériences décrites par Dellu et al. (1992, Brain Res., 588, 132-9) et Ladurelle et al. (2000, Brain Res., 858, 371-9).

Les enseignements techniques de ces deux publications concernant les tests de mémoire spatiale utilisant des labyrinthes sont inclus par référence à la présente demande.

#### 5 **Exemple 9 : Pharmacocinétique**

La pharmacocinétique des molécules testées *in vivo* est réalisée par des dosages effectués par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GCMS)

10 Une étude a été réalisée avec la PREG et la molécule 43B. Son principal objectif était de démontrer que la molécule 43B passait la barrière hématoencéphalique.

On a injecté les rats soit avec la PREG, soit avec 43B diluées dans de l'huile de sésame et dosé par GCMS la quantité de PREG ou de 43B dans différents organes 1h, 4h, 8h et 24h après l'injection (12mg/kg dans 0.5ml d'huile de sésame ;  
15 injection en sous-cutanée).

Les résultats présentés figure 7 montrent que la molécule 43B pénètre rapidement dans la moelle épinière et le cerveau des rats injectés, et tend à s'y accumuler.

20 Ces résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* montrent bien que la molécule 43B (3-méthoxy-PREG) donne des résultats spectaculaires sur la croissance des neurites en culture et sur le modèle de compression médullaire.

#### **Exemple 10 : autres molécules selon l'invention**

25 Les indices de liaison et d'activité sont exprimés en % par rapport à la PREG.

La liaison (affinité) est mesurée par déplacement de la PREG-<sup>3</sup>H.

L'activité est mesurée par l'augmentation de densité optique à 345nm d'un mélange de tubuline et de MAP2 purifiées, incubées à 37°C en présence de GTP.

30 La stimulation de la pousse neuritique est effectuée sur les cellules PC12 différenciées en présence de NGF 10ng/ml et du stéroïde à tester 30 µM pendant 3 jours. Pour chaque condition, la longueur moyenne de 200 neurites, le plus long de chaque cellule, est mesurée sur 3 cultures simultanées.

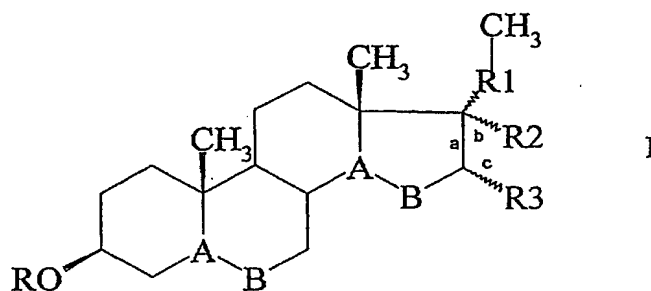
Les résultats sont représentés par 1, 2 ou 3 + selon que la stimulation est inférieure, égale ou supérieure à celle produite par la PREG.

<i>Sterioïde</i>	<i>Affinité</i>	<i>Activité</i>	<i>Pousse neuritique</i>
<i>Prégnénolone (PREG)</i>	100	100	++
<i>3<math>\beta</math>-méthoxy-prégna-5-ène-20-one</i>	100	100	+++
<i>3<math>\beta</math>-méthoxy-prégna-5-ène-20-one-17<math>\alpha</math>-dichlorométhyl</i>	53	113	+++
<i>3<math>\beta</math>-méthoxy-5<math>\alpha</math>-prégnane-20-one</i>	87	10	+++
<i>3<math>\beta</math>-méthoxy-5<math>\alpha</math>-prégnane-20<math>\beta</math>-ol</i>	65	65	++
<i>PREG-16<math>\alpha</math>-méthyl</i>	80	70	++
<i>PREG-16<math>\beta</math>-méthyl</i>	63	67	(++)
<i>3<math>\beta</math>-hydroxy-prégna-5,14-diène-20-one</i>	102	50	+
<i>PREG-16<math>\alpha</math>,17<math>\alpha</math>-époxy</i>	41	54	+
<i>PREG-16<math>\alpha</math>,17<math>\alpha</math>-méthylène</i>	62	49	+
<i>Prégna-5-ène-3<math>\beta</math>,20<math>\beta</math>-diol-20-acétate</i>	60	108	++
<i>3<math>\beta</math>-hydroxy-5<math>\alpha</math>-prégnane-20-one-16<math>\alpha</math>-méthyl</i>	57	53	(+)

Ces résultats démontrent l'efficacité d'autres molécules dérivées de la  
5 prégnénolone pour stimuler la polymérisation des microtubules induite par MAP2, ou la pousse neuritique.

### Revendications

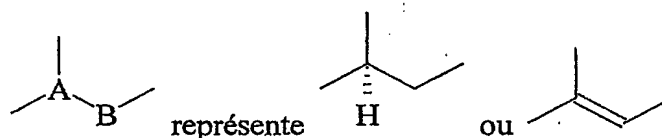
1. Utilisation de la 3-méthoxy prégnénolone ou d'une molécule dérivée de la prégnénolone portant une fonction 3-méthoxy ou présentant une fonction 3' pouvant être convertie en 3-méthyl-éther pour la préparation d'un médicament destiné à traiter une lésion aiguë ou une maladie dégénérative du système nerveux, ladite molécule présentant la formule I :



dans laquelle :

10

$R = H$  ou  $CH_3$  ;



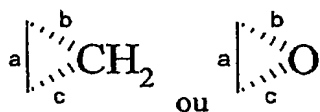
$R1 = -CO-$  ;  $-CH(OH)-$  ou  $-CH(O-COCH_3)-$

$R2 = H$  ou  $CHCl_2$ ,

$R3 = H$  ou  $CH_3$ , ou

15

$R2$  et  $R3$  forment ensemble un cycle :



20

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite maladie est choisie dans le groupe constitué de la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la perte de mémoire induite par des l'âge, la perte de mémoire induite par la prise de substances, une lésion traumatique, une lésion cérébrale, une lésion de la moelle épinière, en particulier une compression médullaire, l'ischémie, la douleur, notamment la douleur névritique, la dégénérescence nerveuse, et la sclérose en plaques.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit médicament comprend également un excipient permettant de formuler ladite 3-méthoxy-prégnénolone ou molécule dérivée pour traverser la barrière hémato-encéphalique.
  - 5 4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit médicament se présente sous forme injectable.
  5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit médicament se présente sous forme permettant une prise orale.
  6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que R est  
10 un groupement CH<sub>3</sub>.
  7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ladite molécule est la 3-méthoxy-PREG.
  8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit médicament comprend une quantité de 3-méthoxy-prégnénolone ou de  
15 molécule dérivée comprise entre 50 et 2500 mg.
  9. 3-méthoxy-prégnénolone en tant que médicament.
  10. Composition pharmaceutique, comprenant de la 3-méthoxy-prégnénolone ou une molécule dérivée de la prégnénolone portant une fonction 3-méthoxy ou présentant une fonction 3' pouvant être convertie en 3-méthyl-éther, de  
20 formule générale I en tant que principe actif, et un excipient pharmaceutiquement acceptable.
  11. Méthode *in vitro* pour augmenter la stabilisation et/ou induire la polymérisation des microtubules dans une cellule comprenant l'étape d'exposer ladite cellule à la présence de 3-méthoxy-prégnénolone, à une  
25 concentration d'environ 0,5 à 50 µmol.
  12. Méthode *in vitro* pour augmenter la pousse des neurites dans une cellule comprenant l'étape d'exposer ladite cellule à la présence de 3-méthoxy-prégnénolone, à une concentration d'environ 0,5 à 50 µmol.
- 
-

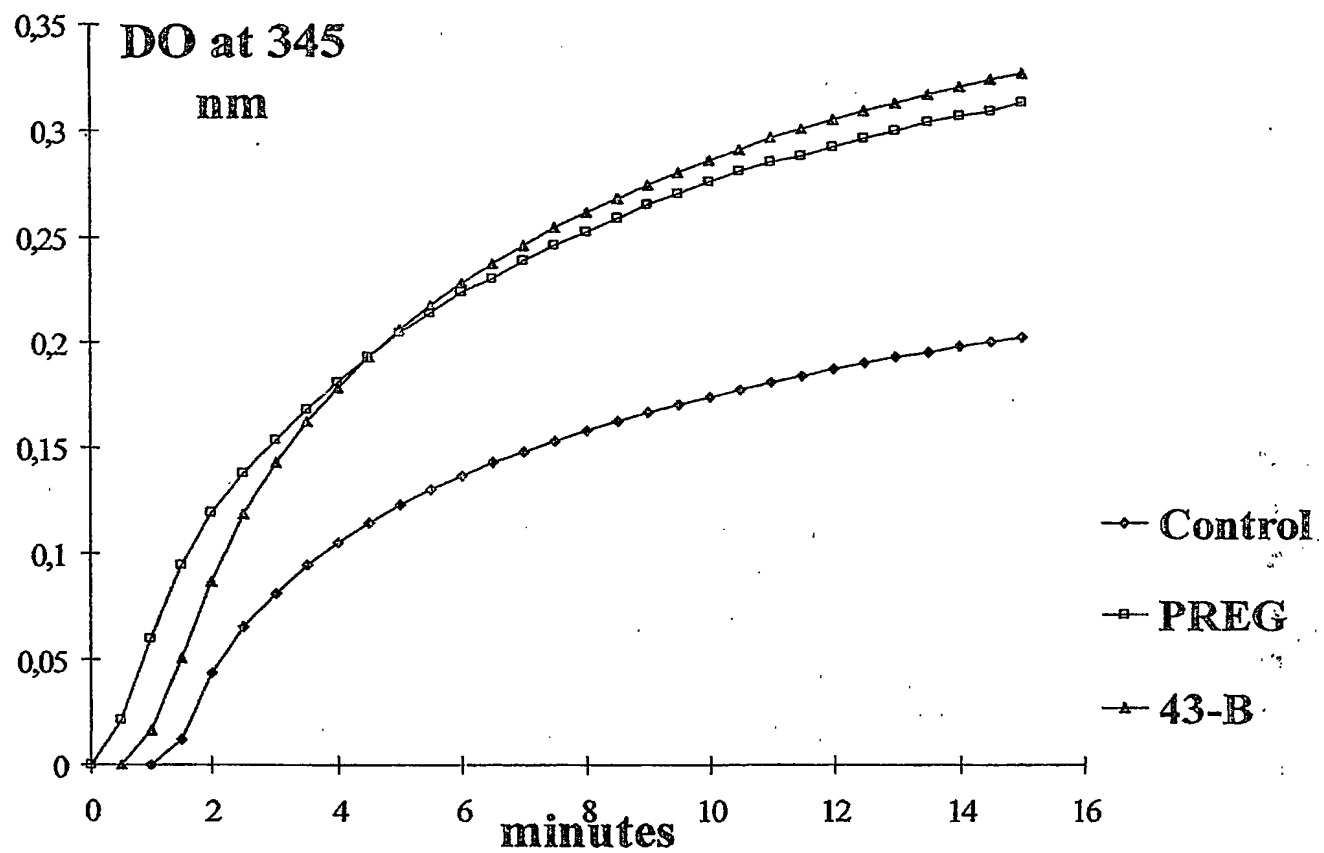


Figure 1



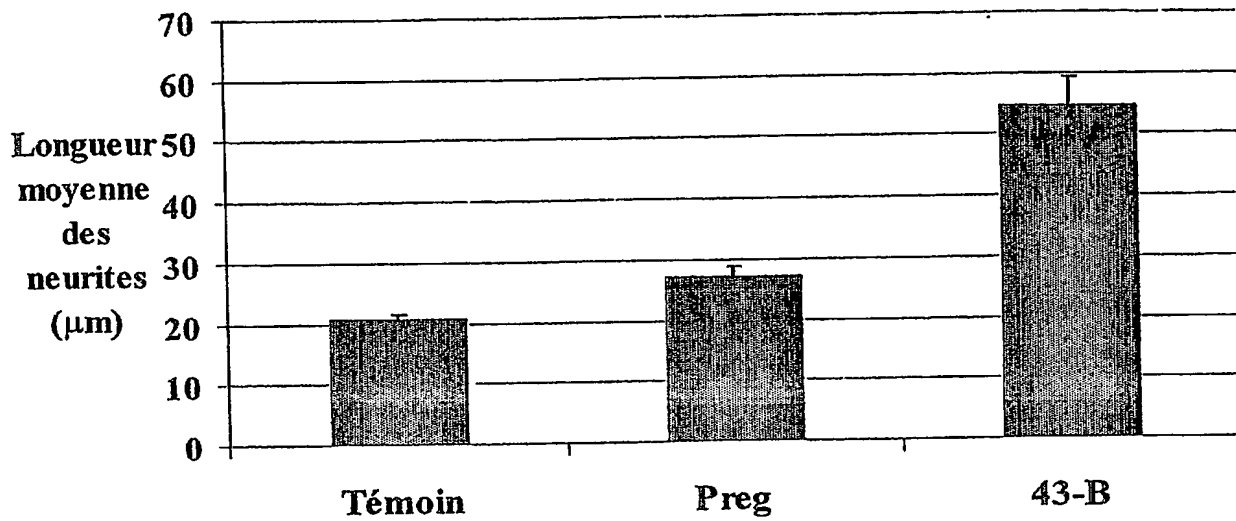


Figure 2

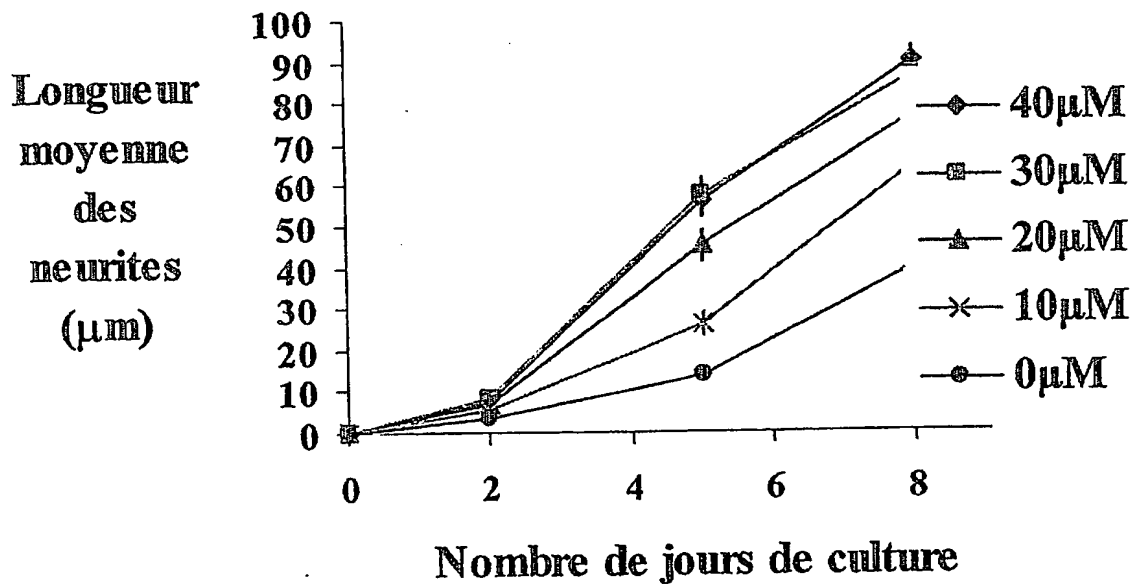
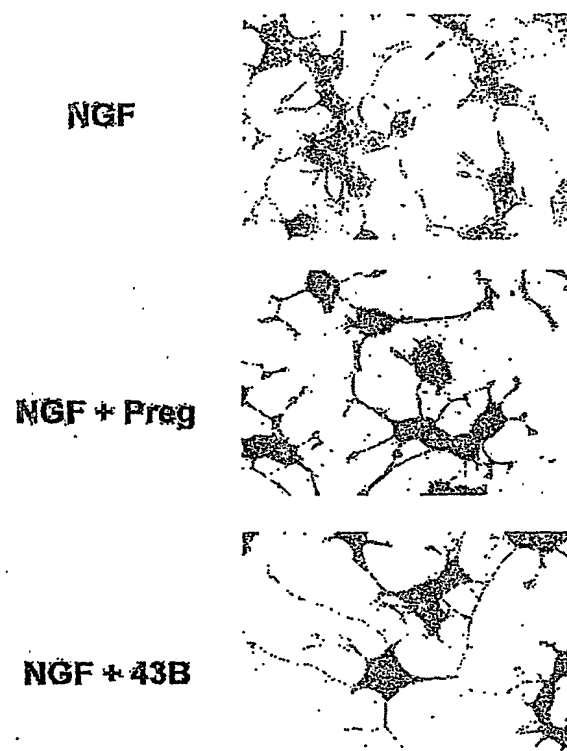


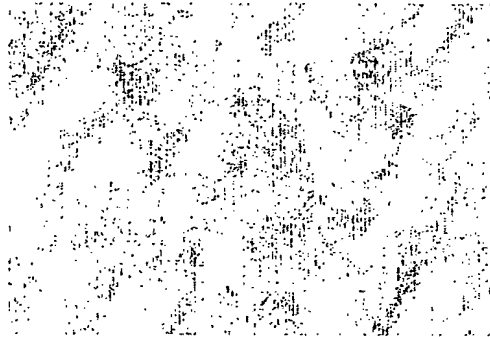
Figure 3



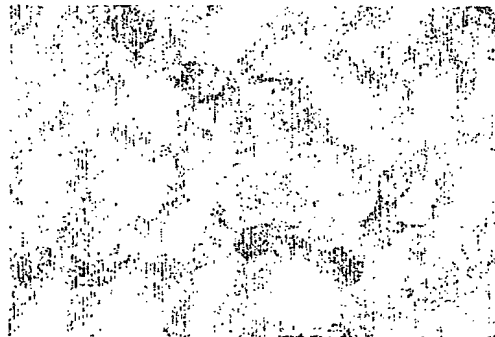
**Figure 4**

## Figure n° 4

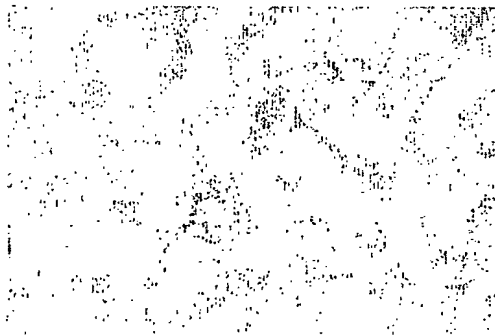
**NGF**



**NGF + Preg**



**NGF + 43B**



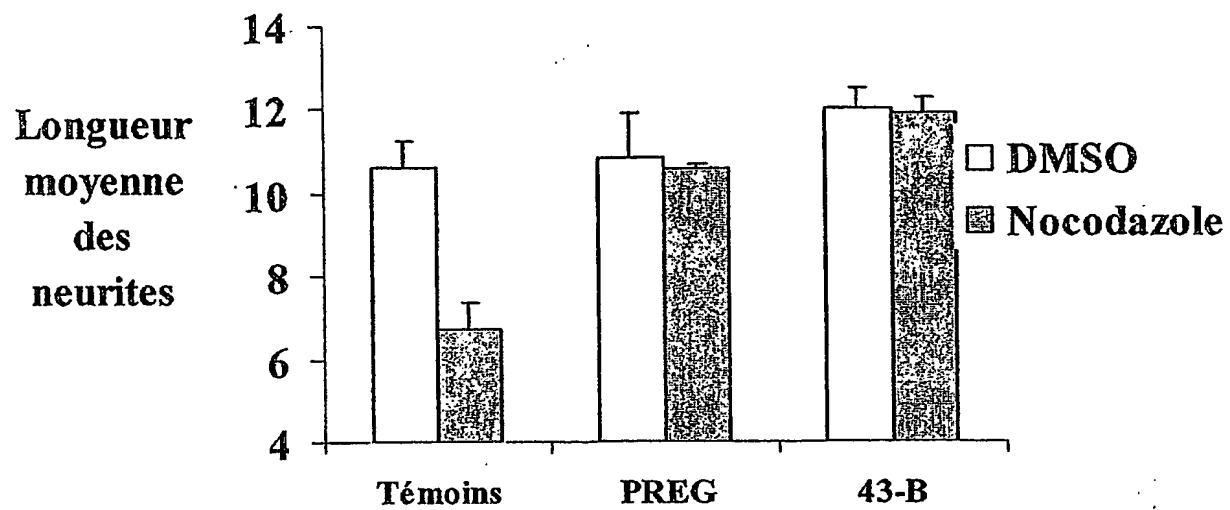


Figure 5

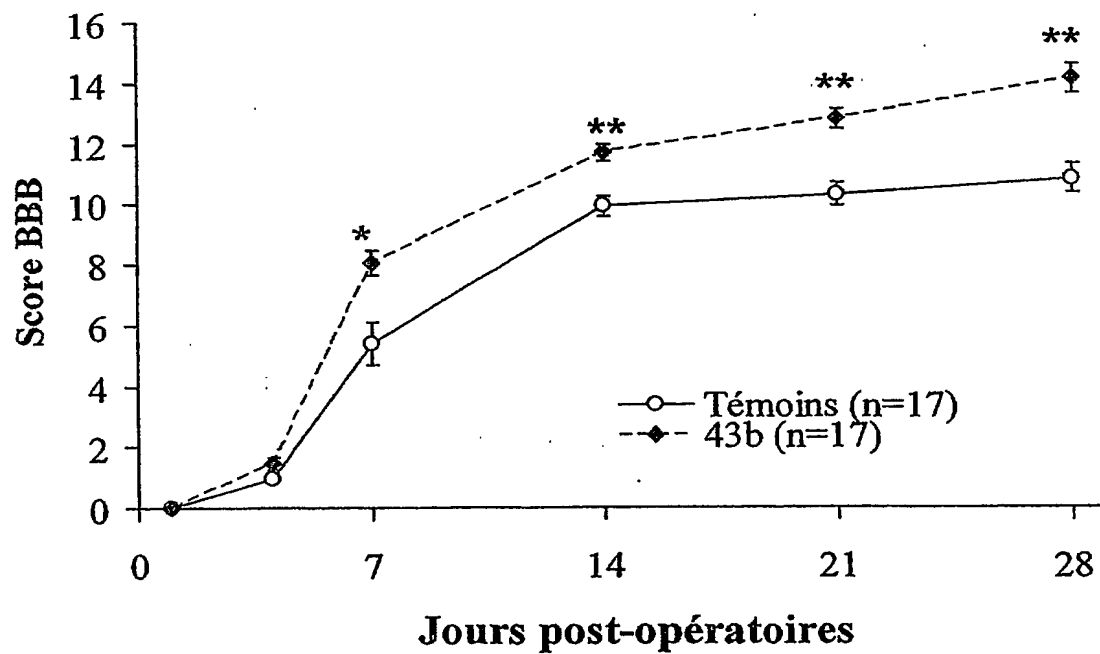


Figure 6

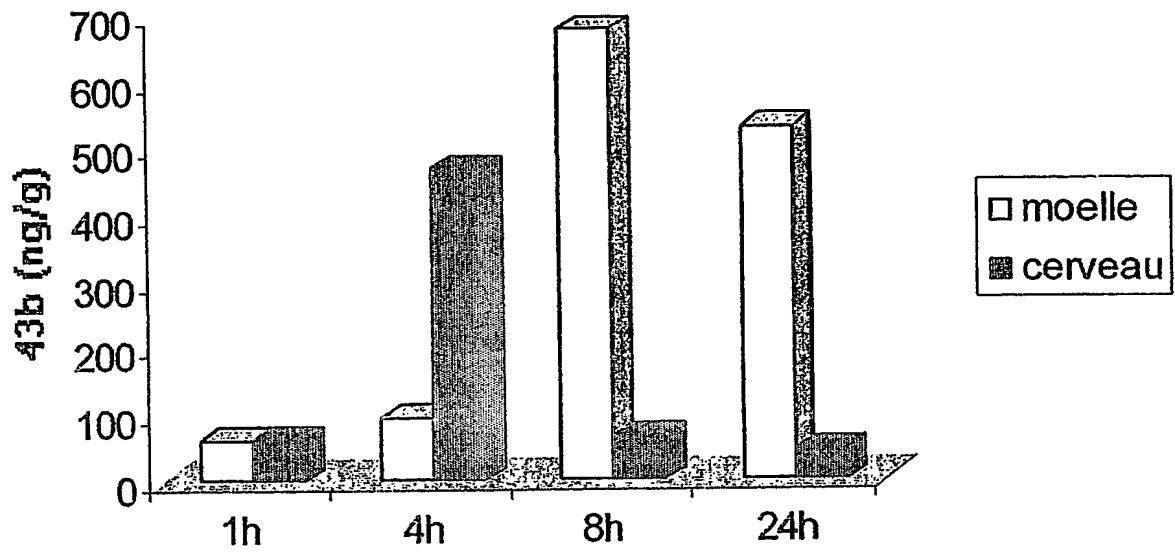


Figure 7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**